Istituto d'Igiene della R. Università di Palermo
diretto dal Prof. L. Manfredi

Il nitro-antrachinone

un nuovo rivelatore della vita microrganica applicabile al controllo dei vaccini e dei sieri

Nota di F. Tallo e G. Parrino

Estratto dal *Giornale di Batteriologia e Immunologia*
Anno II, n. 9 (Settembre 1927)

TIPOGRAFIA EDITRICE « MINERVA »
Via Superga, n. 15 - Torino

Istituto d'Igiene della R. Università di Palermo
diretto dal Prof. L. MANFREDI

Il nitro-antrachinone

un nuovo rivelatore della vita microrganica applicabile al controllo dei vaccini e dei sieri

Nota di F. TALLO e G. PARRINO

Estratto dal *Giornale di Batteriologia e Immunologia*
Anno II, n. 9 (Settembre 1927)

TIPOGRAFIA EDITRICE « MINERVA »
Via Superga, n. 15 - Torino

I rivelatori della vita microrganica hanno acquistato grande importanza nella terapia ipodermica o endovenosa perchè assicurano il pratico della sterilità o meno dei prodotti da iniettare.

Gosio (1), che per primo si occupò dell'argomento, scelse e propose come indicatori il tellurito ed il selenito di potassio, dando la preferenza al primo.

Questi sali infatti vengono ridotti dai germi vivi, e per effetto della riduzione si ha un precipitato nero col tellurito ed un precipitato rosso col selenito.

Il suddetto A. studiò dettagliatamente le condizioni in cui avviene meglio la bioreazione ed indicò la quantità di rivelatore che bisogna aggiungere ai diversi preparati (vaccini, sieri) onde non ostacolare lo sviluppo di eventuali germi inquinanti nè danneggiare l'inoculando.

Risulta infatti che il tellurito, a forte concentrazione, ha potere battericida non solo, ma esercita azione irritativa sui tessuti.

La quantità di tellurio che Gosio consiglia aggiungere al mestruo (siero, vaccino) come indicatore, è di grammi 0,005-0,02 per mille.

---

(1) Gosio: *Indicatoren des Bakterienlebens und ihre praktische Bedeutung*, Zeitschrift für Hygiene, Bd. 51, pag. 65.

In seguito furono escogitati altri processi di rivelazione microbiologica (acqua ossigenata, carminio d'indaco, bleu di metilene ecc....), però in pratica è stata data la preferenza al metodo Gosio.

Recentemente Bieling mise in rilievo il fatto che il nitroantrachinone (sostanza di colore giallo chiaro) si trasforma, per riduzione, in amido-antrachinone (di colore rosso intenso); su tale proprietà del nitro l'A. fondò un metodo colorimetrico per la determinazione quantitativa della respirazione cellulare.

Il nitroantrachinone dunque è atto a rivelare macroscopicamente la vita delle cellule e perciò dei batteri.

Date queste proprietà ci siamo domandati: Perchè non adoperarlo in pratica quale indicatore di possibili inquinamenti del materiale da inoculazione (vaccini, sieri, preparati opoterapici)?

Per vedere se il nitro-antrachinone si presta bene a tale uso, abbiamo fatto le seguenti esperienze:

1) Saggio sulla tossicità o meno del nitro-antrachinone inoculato in organismi animali.

2) Saggio sulla riduzione del nitro-antrachinone aggiunto (in varia concentrazione da 1/1000 - 1/100.000) a diversi preparati iniettabili, e cioè:

a) vaccino inquinato con germi omologhi, o con germi patogeni diversi (tifo, stafilococco, colera, carbonchio, muffe) — o con germi provenienti dall'acqua stagnante di una vasca dell'Istituto (coli, stafilococco, bac. liquefaciens, sarcine, ecc.);

b) siero di sangue e preparati opoterapici (estratti idroglicerici di organi) inquinati con vari germi della stessa acqua.

In ciascuna prova di riduzione facevamo anche altri saggi complementari: uno col tellurito di potassio, che, aggiunto nelle stesse condizioni di inquinamento ai vari preparati, ci serviva da termine di paragone; ed uno col nitroantrachinone, che, aggiunto sterilmente ai varii preparati sterili, ci assicurava se essi da per sè stessi non riducevano il nitro.

L'aggiunta dell'indicatore si faceva nel modo seguente:

Preparavamo in singoli tubi da saggio diluizioni varie di nitroantrachinone in acqua distillata e le sterilizzavamo a vapore fluente per 30'; ovvero la diluizione veniva fatta in una soluzione nutritiva contenente saccarosio, peptone, cloruro sodico, onde vedere se in presenza di dette sostanze, che naturalmente permet-

tono un più rapido sviluppo batterico, la riduzione dell'indicatore si verificasse più rapidamente. Ciò che precedentemente Gosio aveva escogitato per il tellurito.

Siccome però il nitroantrachinone in presenza delle suddette sostanze non può sottoporsi alla sterilizzazione perchè si altera, procedevamo nel modo seguente:

Si preparava una soluzione così composta: Saccarosio gr. 4; Peptone gr. 4, Cloruro sodico gr. 4, Acqua distillata gr. 100, che si sterilizzava a vapore fluente per 30'. Tale soluzione veniva mescolata sterilmente e a parti uguali con quella di nitro. Col miscuglio così formato si facevano i vari saggi.

Al momento dell'uso la soluzione di nitroantrachinone, in varia concentrazione e diluizione, veniva aggiunta ai vari preparati in esperimento (vaccino, siero, ecc....) sterili o inquinati come è stato precedentemente detto.

I vari miscugli venivano messi in fialette che si chiudevano alla fiamma. Con la stessa specie di materiale preparavamo altra serie di fialette nelle quali mettevamo come indicatore il tellurito di potassio.

Per l'aggiunta di questo indicatore ai vari preparati abbiamo seguito scrupolosamente la tecnica consigliata da Gosio (v. Abba: « Manuale di microscopia e batteriologia », pag. 773).

Ogni volta si faceva la conta dei germi inquinanti il liquido per conoscere il numero iniziale di essi; ripetevamo poi la conta quando si manifestava la riduzione dell'indicatore.

Come materiale di esperimento abbiamo scelto: vaccino antitifico, siero di sangue di bue, e due preparati opoterapici del commercio: la Nefrina (estratto di rene di porco) e la Ipofisasi Serono (estratto glicerico totale di ipofisi).

Il saggio sulla tossicità del nitroantrachinone fu fatto su cavie e conigli, ai quali animali inoculammo gr. 0,005-0,025 (dosi queste 5 - 25 volte più grandi di quelle usate come indicatore, riferendosi alla più forte concentrazione di 1/1000, come è stato precedentemente detto).

Ecco in breve i risultati avuti nelle varie esperienze:

Ad una cavia — del peso di gr. 400 — inoculammo nel sottocutaneo gr. 0,005 di nitro al giorno e per 3 volte consecutive; ad un'altra cavia — del peso di gr. 450 — gr. 0,01 a giorni alterni e

per 3 volte consecutive; ad un coniglio — del peso di gr. 1500 — gr. 0,025 a giorni alterni e per 5 volte consecutive.

Tutti e tre gli animali sopportarono le varie inoculazioni; ciò starebbe a dimostrare che il nitro-antrachinone (alla dose da noi adoperata) non eserciterebbe azione tossica sull'organismo animale.

Circa il fenomeno di riduzione, nelle varie prove da noi fatte abbiamo avuto occasione di constatare quanto segue:

I forti inquinamenti iniziali (parecchi milioni di germi per cmc.) riducevano l'indicatore in pochi minuti (10-15).

Il nitro-antrachinone aggiunto nelle proporzioni di 1/100 - 1/10000 ai vari preparati iniettabili (vaccini, sieri) inquinati con germi vari (numero iniziale 80-200 per cmc.) e tenuti a temperatura ambiente (10°-18° C.) venne ridotto in amido-antrachinone in 4-6 giorni.

Tenendo le fialette a 37° C., per il più rapido sviluppo dei germi, il fenomeno di riduzione avveniva qualche giorno prima.

Quando poi si aggiungeva come indicatore il nitro-antrachinone mescolato al saccarosio, peptone, cloruro sodico, la riduzione comparativamente a quella del nitro diluito in acqua distillata avveniva in un tempo molto più breve (36-38 ore).

Tale riduzione si manifestò più intensa (colorito rosso carico) quando il nitro interveniva a più forte concentrazione (1/1000 - 1/10000). Dopo la riduzione dell'indicatore il numero dei germi era molto aumentato rispetto a quello iniziale (15-45 milioni per cmc.).

Diminuendo le proporzioni dell'indicatore (1/25000-1/100000) la riduzione era debole e si verificava con ritardo (7-13 giorni); il liquido delle fialette infatti prendeva una lieve tinta rosea.

Nessun fenomeno di riduzione si ebbe, anche dopo 4 mesi di osservazione, quando il nitro si aggiunse ai vari preparati sterili.

Il nitro aggiunto agli estratti idro-gligerici di organi inquinati non venne mai ridotto.

La mancanza di riduzione in questo caso non dipende dalla glicerina per se stessa, ma è probabilmente dovuta al fatto che i germi in presenza di glicerina non si sviluppano.

Tale nostra asserzione deriva dall'osservazione che i forti inquinamenti iniziali anche in presenza di glicerina provocano riduzione dell'indicatore.

Nelle prove comparative fatte col tellurito di potassio abbiamo osservato che questo — aggiunto nelle proporzioni di 1/200.000 - 1/50.000 (dosi adoperate da Gosio) ai vari preparati nelle condizioni di inquinamento sopra indicate — veniva ridotto dopo 9-12 giorni; allora si aveva però un numero ∞ di germi per cmc.

Il tellurito aggiunto agli estratti glicerici di organi non diede — neppur esso — riduzione apprezzabile.

Conclusioni

Il nitro-antrachinone alla dose di 1/1000 - 1/10000 si presta benissimo a rivelare gli eventuali inquinamenti dei vari preparati iniettabili (vaccini, sieri).

Sono proprietà che lo rendono apprezzabile sotto questo riguardo:

a) la brevità di tempo in cui avviene la riduzione, specie quando il nitro viene mescolato a piccole dosi di saccarosio e peptone, i quali favorirebbero il rapido sviluppo di germi;

b) la chiara manifestazione della riduzione (il liquido prende un colorito rosso intenso);

c) la nessuna tossicità a dosi molto superiori a quelle nelle quali può essere adoperato come indicatore.

In presenza di preparati contenenti glicerina (estratti glicerici di organi) il nitroantrochinone, similmente come avviene per altri biorivelatori (telluriti), non presenta riduzione che solo nel caso di forti inquinamenti iniziali.